

氏名(本籍)	吉村明浩(岐阜県)
学位の種類	博士(工学)
学位授与番号	甲第 234 号
学位授与日付	平成 16 年 6 月 16 日
専攻	物質工学専攻
学位論文題目	リボヌクレアーゼL/2-5A複合体の構造と機能に関する研究 (Studies on structure and function of ribonuclease L/2-5A complex)
学位論文審査委員	(主査) 教授 北出幸夫 (副査) 教授 西川一八 教授 木内一壽 助教授 上野義仁

論文内容の要旨

リボヌクレアーゼ L (RNase L) は 2', 5'-オリゴアデニル酸 (2-5A) を必須活性化因子とする RNA 分解酵素である。RNase L と 2-5A はインターフェロンによる抗ウイルス機構「2-5A システム」を構成し、RNase L/2-5A 複合体はウイルスおよび細胞内 RNA を分解してタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの増殖を妨げる。RNase L は 2-5A を機能発現の鍵分子とする活性制御機構を備えた唯一の酵素であり、本酵素の触媒機構は酵素学的観点からも興味深い。本酵素の酵素機能の解明は複合体形成に関する研究が先行しており、RNase L の活性化から RNA 分解に至る一連の触媒機構は明らかにされていない。そこで、本研究では RNase L の触媒機構の解明を目指し、酵素活性に必要な RNase L/2-5A 複合体の構造と機能を明らかにすることを目的として研究している。

本研究の基盤となるヒト組換え型 RNase L 発現系を構築するとともに、活性測定法を確立し、次いでこれらの系を利用して塩基部修飾型 2-5A 誘導体の RNase L 活性化能を再評価し、RNase L 活性化能と塩基部修飾効果との関係を検討している。塩基部 2 位あるいは 8 位を臭素 (br^2A , br^8A) もしくはメチル基 (me^2A , me^8A) で置換したアデノシンを組み込んだ 2-5A のうち、 $pApAp(br^2A)$ および $pApAp(me^2A)$ は未修飾体 ($pApApA$) と比較して低い活性化能を、 $pApAp(br^8A)$ および $pApAp(me^8A)$ は未修飾体と比較して高い活性化能を示すことを見出している。アデノシン塩基部 2 位あるいは 8 位への臭素あるいはメチル基導入は糖-塩基配向に影響を与え、それぞれ *anti* 型配向あるいは *syn* 型配向を優先する。これまで 2-5A 誘導体は異なる反応系で評価されていたため誘導体間の RNase L 活性化能を直接比較することは困難であった。本研究において 2-5A の 5' 末端から 3 番目 (2' 末端) の *anti* - *syn* 配向が RNase L 活性に影響を及ぼし、RNase L 活性の増強には *syn* 型配向の導入が効果的であることを明確にしている。さらに、RNase L の二量体形成能の測定において $pApAp(br^8A)$ および $pApAp(me^8A)$ は $pApApA$ と比較して RNase L を効率良く二量体へ変換することを見出している。塩基部 8 位置換 2-5A の活性化能が増強される理由は、これまで

に報告されている RNase L との結合能のわずかな向上だけでなく、RNase L/2-5A 複合体の二量体形成が促進されるためでもあることを発見している。

次に RNase L の触媒反応に重要なアミノ酸残基を探索し、その役割を検討している。RNase L は N 末端側領域の活性制御領域と、C 末端側領域の触媒領域から構成される。欠失変異体実験から C 末端側領域の Glu711-His720 の 10 アミノ酸残基が RNA 分解および RNA 結合に重要な役割を果たすことが示唆されているが、この領域の役割は明らかにされていない。そこで、本研究では Glu711 -His720 の機能を明らかにするため、スキニング変異解析を実施している。まず、各アミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した 10 種の変異酵素を作製し、RNA 分解活性および RNA 結合活性を測定したところ Y712A, H715A および F716A に活性の減弱が認められ、Tyr712, His715 および Phe716 が RNA 分解活性および RNA 結合に機能していることを見出している。特に著しく活性の低下した Y712A および F716A に注目し、Tyr712 および Phe716 の機能を明らかにするため、変異酵素 Y712F, F716L および F716Y を作製して、RNA 分解活性と RNA 結合活性を評価している。Y712F は基質結合能が野生型酵素と比較して上昇したものの RNA 分解活性が低下したことから、側鎖の芳香環が基質結合に働くとともにフェノール性水酸基が触媒反応に機能することを見出している。一方、Phe716 を置換した 3 種の変異酵素は、いずれも基質結合能および RNA 分解活性が低下した。RNA 分解活性および基質結合能は、野生型 > F716L > F716Y > F716A の順で低下し、各アミノ酸の疎水性の強さ Phe > Leu > Tyr > Ala と一致していたことから、Phe716 は疎水性クラスターの一部を形成して、基質結合に寄与すると結論付けている。

本研究では、RNase L の触媒機構の解明に向けて RNase L と 2-5A の両面から研究を進め、RNase L/2-5A 複合体が触媒機能を発揮するための二量体形成において 2-5A の立体構造が重要であることを示している。また、RNA 結合および分解には RNase L の Tyr712 および Phe716 が関与することを示している。

論文審査結果の要旨

リボヌクレアーゼ L (RNase L) は 2', 5'-オリゴアデニル酸 (2-5A) を必須活性化因子とする RNA 分解酵素である。RNase L と 2-5A はインターフェロンによる抗ウイルス機構「2-5A システム」を構成し、RNase L/2-5A 複合体はウイルスおよび細胞内 RNA を分解してタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの増殖を妨げる。RNase L は 2-5A を機能発現の鍵分子とする活性制御機構を備えた唯一の酵素であり、本酵素の触媒機構は酵素学的観点からも興味深い。本酵素の酵素機能の解明は複合体形成に関する研究が先行しており、RNase L の活性化から RNA 分解に至る一連の触媒機構は明らかにされていない。そこで、本研究では RNase L の触媒機構の解明を目指し、酵素活性に必要な RNase L/2-5A 複合体の構造と機能を明らかにすることを目的として研究している。

本研究の基盤となるヒト組換え型 RNase L 発現系を構築するとともに、活性測定法を確立し、次いでこれらの系を利用して塩基部修飾型 2-5A 誘導体の RNase L 活性化能を再評価し、RNase L 活性化能と塩基部修飾効果との関係を検討している。塩基部 2 位あるいは 8

位を臭素 (br^2A , br^8A) もしくはメチル基 (me^2A , me^8A)で置換したアデノシンを組み込んだ 2-5A のうち、 $pApAp(br^2A)$ および $pApAp(me^2A)$ は未修飾体 ($pApApA$) と比較して低い活性化能を、 $pApAp(br^8A)$ および $pApAp(me^8A)$ は未修飾体と比較して高い活性化能を示すことを見出している。アデノシン塩基部 2 位あるいは 8 位への臭素あるいはメチル基導入は糖-塩基配向に影響を与え、それぞれ *anti* 型配向あるいは *syn* 型配向を優先する。これまで 2-5A 誘導体は異なる反応系で評価されていたため誘導体間の RNase L 活性化能を直接比較することは困難であった。本研究において 2-5A の 5' 末端から 3 番目 (2' 末端) の *anti* - *syn* 配向が RNase L 活性に影響を及ぼし、RNase L 活性の増強には *syn* 型配向の導入が効果的であることを明確にしている。さらに、RNase L の二量体形成能の測定において $pApAp(br^8A)$ および $pApAp(me^8A)$ は $pApApA$ と比較して RNase L を効率良く二量体へ変換することを見出している。塩基部 8 位置換 2-5A の活性化能が増強される理由は、これまでに報告されている RNase L との結合能のわずかな向上だけでなく、RNase L/2-5A 複合体の二量体形成が促進されるためでもあることを発見している。

次に RNase L の触媒反応に重要なアミノ酸残基を探索し、その役割を検討している。RNase L は N 末端側領域の活性制御領域と、C 末端側領域の触媒領域から構成される。欠失変異体実験から C 末端側領域の Glu711-His720 の 10 アミノ酸残基が RNA 分解および RNA 結合に重要な役割を果たすことが示唆されているが、この領域の役割は明らかにされていない。そこで、本研究では Glu711 -His720 の機能を明らかにするため、スキニング変異解析を実施している。まず、各アミノ酸残基をそれぞれ Ala に置換した 10 種の変異酵素を作製し、RNA 分解活性および RNA 結合活性を測定したところ Y712A, H715A および F716A に活性の減弱が認められ、Tyr712, His715 および Phe716 が RNA 分解活性および RNA 結合に機能していることを見出している。特に著しく活性の低下した Y712A および F716A に注目し、Tyr712 および Phe716 の機能を明らかにするため、変異酵素 Y712F, F716L および F716Y を作製して、RNA 分解活性と RNA 結合活性を評価している。Y712F は基質結合能が野生型酵素と比較して上昇したものの RNA 分解活性が低下したことから、側鎖の芳香環が基質結合に働くとともにフェノール性水酸基が触媒反応に機能することを見出している。一方、Phe716 を置換した 3 種の変異酵素は、いずれも基質結合能および RNA 分解活性が低下した。RNA 分解活性および基質結合能は、野生型 > F716L > F716Y > F716A の順で低下し、各アミノ酸の疎水性の強さ Phe > Leu > Tyr > Ala と一致していたことから、Phe716 は疎水性クラスターの一部を形成して、基質結合に寄与すると結論付けている。

本研究では、RNase L の触媒機構の解明に向けて RNase L と 2-5A の両面から研究を進め、RNase L/2-5A 複合体が触媒機能を発揮するための二量体形成において 2-5A の立体構造が重要であることを示している。また、RNA 結合および分解には RNase L の Tyr712 および Phe716 が関与することを示している。

以上に詳しく述べたように、本論文ではヒト遺伝子組換えリボヌクレアーゼ L (RNase L) と 2', 5' -オリゴアデニル酸 (2-5A) 誘導体との複合体の構造と機能を解明している。得られた知見は、2-5A システムを利用した抗ウイルス薬や抗癌薬の開発および治療薬の選択に重要な示唆を与えるものであり、この論文の有用性は極めて高い。従って、審査の結

果、この論文を学位論文に値するものと判定した。

最終試験結果の要旨

この論文の主要部分は、審査付き論文として公表済み及び印刷中の 2 編の論文である。この論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

公聴会において、学位論文の内容を中心として、またこれに関する事項、即ち RNase L と 2-5A の構造と機能、RNase L の一塩基多型と疾病との関連、インターフェロンの抗ウイルス機構、および今後の展開や本研究の将来性などに関して諮問を行った。論文申請者から、十分な内容を持った回答が得られたので、最終試験にも合格したと判定した。